

10/50/525

R E P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

PCT/FR 03 / 00 157



REC'D 07 APR 2003

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JAN. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

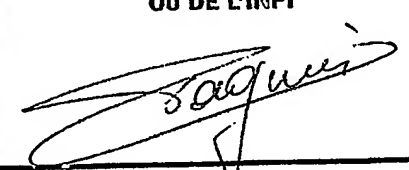
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 260899

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>18 JAN 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0200582</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>18 JAN. 2002</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  BECKER ET ASSOCIES 10 rue de Milan 75009 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0097FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)  METHODE D'IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		GENFIT	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		4 . 2 . 4 . 3 . 4 . 1 . 9 . 0 . 7 ;	
Code APE-NAF		7 . 3 . 1 . Z .	
Adresse	Rue	Parc Eurasanté - Lille Métropole 885, avenue Eugène Avinée	
	Code postal et ville	59120	LOOS
Pays		France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE <b>18 JAN 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0200582</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI		DB 540 W / 260093	
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>			B0097FR		
<b>6 MANDATAIRE</b>					
Nom			BECKER		
Prénom			Philippe		
Cabinet ou Société			BECKER ET ASSOCIES		
N ° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			97-0800		
Adresse	Rue	10, rue de Milan			
	Code postal et ville	75009	PARIS		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			01 44 53 84 00		
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			01 44 53 84 10		
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			becker@becker.fr		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>					
Les inventeurs sont les demandeurs			<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non		
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes					
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)			<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>		
BECKER Philippe n° 97-0800					

La loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'Informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

## METHODE D' IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE

La présente invention concerne des méthodes de criblage de molécules  
5 actives, en particulier de molécules ayant une activité dans la modulation  
de la différenciation adipocytaire. L' invention se rapporte également à  
des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise  
en œuvre de telles méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-  
adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur  
10 *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules.  
L' invention peut être mise en œuvre pour l' identification de composés  
actifs ou utilisables comme têtes de séries pour le développement de  
médicaments actifs pour la prise en charge de pathologies métaboliques,  
notamment pour le traitement du diabète, de l' obésité, de l' insulino-  
15 résistance et/ou du syndrome X.

L' invention est basée notamment sur la mise en évidence et la  
caractérisation du rôle d' un récepteur nucléaire particulier, *REV-ERB*  
*ALPHA*, dans les mécanismes de différenciation adipocytaire, et  
20 notamment sur la capacité de ce récepteur, lorsqu' il est sur-exprimé, de  
sensibiliser les cellules à l' action de facteurs de différenciation  
adipocytaire. L' invention repose également sur l' obtention de vecteurs  
particuliers permettant l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi  
que de lignées cellulaires génétiquement modifiées, notamment des pré-  
25 adipocytes. Les résultats obtenus montrent une modulation de la  
différenciation adipocytaire de telles lignées lorsqu' elles sont mises en  
contact avec des agonistes ou des antagonistes des récepteurs intervenant  
directement ou indirectement dans le processus de différenciation  
adipocytaire.

Le tissu adipeux blanc est le principal lieu de stockage de l'énergie chez les eucaryotes. Son rôle est de mettre en réserve les triglycérides en période d'abondance et de les mobiliser lorsque l'apport énergétique diminue. Une dérégulation de l'activité des adipocytes se traduit par l'obésité et ses conséquences comme le diabète non-insulino dépendant. Les adipocytes qui constituent le tissu adipeux blanc sont des cellules hautement spécialisées qui expriment un ensemble défini de gènes caractéristiques de leur différenciation (Fajas et al, Curr. Opin. Cell Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, Phys. Rev 78, 783-809 (1998)).

La différenciation adipocytaire est un processus complexe dont les acteurs moléculaires sont de mieux en mieux connus (Fajas et al, Curr. Opin. Cell Biol 10: 165-173 (1998); Spiegelman, Diabetes 47:507-514 (1998), Gregoire F, Phys. Rev 78, 783-809 (1998)). La différenciation adipocytaire est régulée de manière coordonnée par un réseau de plusieurs facteurs de transcription. Elle est initiée par la sortie du cycle cellulaire et l'activation des facteurs C/EBP bêta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c) qui induisent l'expression du récepteur nucléaire activé par les « proliférateurs des peroxisomes » de type gamma, ci après dénommé PPAR GAMMA, le coordinateur principal de la différenciation adipocytaire.

Le récepteur PPAR GAMMA stimule la sortie du cycle cellulaire et l'expression de gènes spécifiques des adipocytes qui permettent le stockage de l'énergie. Enfin, le facteur de transcription C/EBP alpha coopère avec le récepteur PPAR GAMMA dans les étapes ultimes de la différenciation adipocytaire pour induire un nouvel ensemble de gènes et pour maintenir l'expression dudit récepteur PPAR GAMMA.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un récepteur nucléaire orphelin dont les ligands naturels ou artificiels sont inconnus. Sa séquence est codée par le brin non-codant du gène codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes de type alpha (Lazar, M.A. et al. 1989, Mol.Cell.Biol. 9(3), 1128-1136), (Lazar, M.A. et al. 1990, DNA Cell Biol. 9(2), 77-83), (Laudet, V. et al. 1991, Nucleic Acid Res. 19(5), 1105-1012). Il agit principalement comme inhibiteur de la transcription. Son expression semble augmenter lors de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes et est corrélée à l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire (Chawla, 1993 ; J.Biol.Chem. 266,12, pp 16265-16269).

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit en tant que régulateur négatif de la transcription (Laudet, V. et al. 1995, Curr.Biol. 5(2),124-127). Il a été montré que le récepteur humain *REV-ERB ALPHA* régule sa propre expression (Adelmant ,G. et al. 1996, Proc.Natl;Acad.Sci. USA 93(8), 3553-3558). L' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se trouve fortement exprimé dans des tissus tels que les tissus adipeux, les muscles striés, les tissus hépatiques ou cérébraux, alors que son expression est moins abondante dans d' autres tissus.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* est induit durant la différenciation adipocytaire (Chawla, A. et al. 1993, J.Biol.Chem. 268(22), 16265-16269). Toutefois, le mécanisme moléculaire de cette régulation demeure inconnu. Il a également été observé que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est impliqué dans la différenciation musculaire (Downes M. et al. 1995, Mol.Endocrinol. 9(12), 1666-1678) et dans le mécanisme de régulation du métabolisme lipidique, du fait de l' identification du gène apo AI (gène codant pour l' apolipoprotéine AI) du rat en tant que gène cible du récepteur *REV-ERB*

*ALPHA* dans le foie (Vu-Dac, N. 1998, J.Biol.Chem. 273, 25713-25720). Il a aussi été suggéré que le récepteur *REV-ERB ALPHA* agit comme un modulateur des signaux hormonaux thyroïdiens, (Lazar M.A. 1990, J.Biol.Chem. 265(22), 12859-12863), (Munroe, S.H. et al. 1991, J.Biol.Chem. 266(33), 22803-22806). En effet, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie à l'élément de réponse de l'hormone DR4 (Spanjaard, R.A. et al. 1994, Mol. Endocrinol. 8(3), 286-295) et inhibe la formation de l'homodimère TR et des hétérodimères TR/RXR du TREs (Downes, M. et al. 1995, Mol.Endocrinol. 9, 1666-1678).

10

A ce jour, le rôle biologique du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux et son mécanisme d'action demeurent inconnus (Chawla, A. et al. 1993, J.Biol.Chem. 268(22), 16265-16269).

15 Les travaux menés par les inventeurs ont maintenant permis d'élucider des interactions entre deux récepteurs, *REV-ERB ALPHA* et PPAR GAMMA. Ces travaux ont montré que le récepteur PPAR GAMMA active la transcription du gène *Rev-erb alpha* via l'élément de réponse DR2 du promoteur du gène *Rev-erb alpha* (dénommé « Rev-DR2 »). Les inventeurs ont ainsi pu déterminer que le gène *Rev-erb alpha* est une cible du récepteur PPAR GAMMA, que le récepteur *REV-ERB ALPHA* est un promoteur de la différenciation adipocytaire induite par le récepteur PPAR GAMMA, et qu'il joue un rôle modulateur dans le processus d'adipogenèse.

25

Les inventeurs ont également montré que, de manière surprenante, la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans des pré-adipocytes, comme la lignée cellulaire 3T3-L1, augmente la différenciation desdits

pré-adipocytes et accroît l'expression du récepteur PPAR GAMMA dans ces cellules.

Les inventeurs ont ainsi identifié des mécanismes régulateurs entre les récepteurs *REV-ERB ALPHA* et d' autres récepteurs impliqués dans le programme de différenciation adipocytaire, notamment le récepteur PPAR GAMMA. Sur la base de ces travaux, il est maintenant proposé une nouvelle méthode de criblage de composés susceptibles d' interagir soit avec le récepteur *REV-ERB ALPHA* soit avec lesdits autres récepteurs impliqués dans le programme de différenciation adipocytaire.

Une telle méthode est utile pour identifier des composés actifs dans le traitement des pathologies liées à des anomalies métaboliques mettant en œuvre lesdits récepteurs, telles que la différenciation adipocytaire, le diabète, l' obésité, l' insulino-résistance et le syndrome X.

On sait que certains composés utiles pour le traitement des maladies liées à des anomalies de la différenciation adipocytaire, telles que le diabète ou l' obésité, agissent via leurs interactions avec le récepteur PPAR GAMMA. Par exemple, les thiazolidinediones, aussi appelés glitazones, des composés utilisés pour le traitement de la résistance à l'insuline, ont été identifiés comme étant des ligands et des activateurs artificiels du récepteur PPAR GAMMA. Des dérivés des acides gras ont par ailleurs été identifiés comme étant des ligands naturels du récepteur PPAR GAMMA. Les fibrates sont également des régulateurs puissants du métabolisme lipidique qui agissent en tant qu' activateurs du récepteur PPAR ALPHA.

Les résultats obtenus par les inventeurs, issus d' études *in vivo* et *in vitro* qui sont présentées dans la présente demande montrent que le traitement



avec la rosiglitazone (également appelée BRL49653 ou BRL) augmente l' expression de l' ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Les glitazones, composés antidiabétiques couramment utilisés dans le traitement du diabète de type 2, induisent donc le programme de  
5 différenciation adipocytaire via la liaison et l' activation du récepteur nucléaire PPAR GAMMA.

Un premier aspect de la présente invention concerne donc des méthodes de criblage de molécules actives, en particulier de molécules ayant une  
10 activité dans la modulation de la différenciation adipocytaire, basées sur l' utilisation du récepteur *REV-ERB ALPHA* comme cible moléculaire.

Un autre aspect de l' invention se rapporte à des constructions génétiques, cellules et compositions utiles pour la mise en œuvre de telles  
15 méthodes de criblage, par exemple des cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées pour sur-exprimer le récepteur *REV-ERB ALPHA*, ainsi que les procédés de préparation desdites cellules.

Un aspect particulier de l' invention porte également sur des virus recombinants (ou sur des vecteurs viraux) codant un polypeptide *REV-  
20 ERB ALPHA*.

Un autre aspect de l' invention concerne l' utilisation de composés actifs pour la mise en œuvre de méthodes de traitement thérapeutique ou  
25 vaccinal du corps humain ou animal. Il s' agit notamment de composés capables d' interférer sur la liaison du récepteur PPAR GAMMA au site Rev-DR2 ou, plus généralement, sur l' activité ou l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différenciation adipocytaire.

## Récepteur *REV-ERB ALPHA*

La présente invention repose notamment sur l'identification du rôle du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans la différenciation des adipocytes, sur la caractérisation des mécanismes qui sous-tendent ce rôle, et sur l'exploitation de cette molécule dans un but thérapeutique.

Au sens de la présente invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur nucléaire comprenant la séquence primaire en acides aminés SEQ ID NO : 4, ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.

MTTLDNNTGGVITYIGSSGSSPSRTSPESLYSDNSNGSFQSLTQGCPTYFPPSPT  
 GSLTQDPARSFGSIPPSLSDDGSPSSSSSSSSSSSSSFYNGSPPGSLQVAMEDSSRV  
 SPSKSTSNITKLNGMVLLCKVCGDVASGFHYGVHACEGCKGFFRRSIQQNIQYKRCL  
 15 KNENCIVIRINRNRCCQCRFKCLSVGMSRDAVRFGRIKREKQRMLAEMQSAMNL  
 ANNQLSSQCPLETSPTQHPTGPMGSPPPAPVPSPLVGFSQFPQQLTPPRSPSPE  
 PTVEDVISQVARAHREIFTYAHDKLGGSPGNFNANHASGSPPATTPHRWENQGCPP  
 APNDNNTLAAQRHNEALNGLRQAPSSYPPTWPPGPAHHSCHQSNSNGHRLCPTHV  
 YAAPEGKAPANSRQGN SKNVLLACPMNMYPHGRSGRTVQEIWEDFSMSFTPAVR  
 20 EVVEFAKHIPGFRDLSQHDQVTLLKAGTFEVL MVRFASLFNVKDQTMFLSRTTYSL  
 QELGAMGMGDLLSAMFDFSEKLNLSALTEELGLFTAVVLVSADRSGMENSASVEQ  
 LQETLLRALRALVLKNRPLETSRFTKLLKL PDLRTLNNMHSEKLLSFRVDAQ  
 (séquence SEQ ID NO :4)

25 Le terme « fragment » désigne typiquement un polypeptide comprenant de 5 à 200 acides aminés consécutifs de la SEQ ID NO : 4, préférentiellement de 5 à 150, encore plus préférentiellement de 5 à 100. Des exemples particuliers de fragments sont des polypeptides de 5 à 80 acides aminés. Préférentiellement, les fragments comprennent un domaine fonctionnel de la séquence SEQ ID NO : 4, par exemple un domaine inhibiteur de la transcription et/ou un domaine de liaison à l'ADN. Le terme variant fonctionnel englobe les variants naturels, notamment ceux résultant de

polymorphisme(s), épissage(s), variation(s) entre espèces, etc.. Ce terme inclut également des variants synthétiques, notamment des polypeptides comprenant une séquence dérivée de la séquence SEQ ID NO : 4 par une ou plusieurs mutations, délétions, substitutions et/ou additions d' un ou plusieurs résidus. Préférentiellement, un variant synthétique comporte 75% d' homologie de séquence primaire avec la séquence SEQ ID NO : 4, plus préférentiellement, au moins 85%. Les fragments ou variants peuvent en outre comporter des régions hétérologues ajoutées ou des modifications chimiques, enzymatiques, immunologiques, etc.. De telles modifications peuvent permettre par exemple de faciliter la production ou la purification du récepteur, d' améliorer sa stabilité, d' augmenter son activité, etc..

Dans un mode préféré de l' invention, le terme récepteur *REV-ERB ALPHA* désigne un récepteur d' origine humaine, notamment un récepteur comprenant la séquence SEQ ID NO : 4 ou un fragment de celle-ci.

Le terme gène *Rev-erb alpha* désigne généralement toute portion du génome codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant.

Le terme « construction génique *Rev-erb alpha* » ou « acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* » désigne généralement tout acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA* tel que défini ci-avant. Il peut s' agir d' un ADN ou d' un ARN, par exemple d' un ADN génomique, d' un ADNc, d' un ARNm, d' un ADN synthétique ou semi-synthétique. Ceux-ci peuvent être obtenus par clonage à partir de banques ou plasmides, ou par synthèse, ou par toute autre technique connue de l' homme de l' art.

Dans un mode de réalisation particulier de l' invention, la construction génique Rev-erb alpha est un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 3, un fragment de celle-ci, ou toute séquence s' hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence modérée et codant un

5 récepteur *REV ERB ALPHA*.

```

        atg acgacctgg actccaaca caacacaggt
661 ggcgtcatca cctacattgg ctccagtggc tcttcccaa gccgcaccag cctgaatcc
721 ctctatagtg acaactccaa tggcagcttc cagtccctga cccaaggctg tccacctac
10 781 tcccacat cccccactgg ctccctacc caagaaccgg ctgctcctt tgggagcatt
841 ccaccagcc tgagtgatga cggctccct tcttctcat ctctctgic gtcctctcc
901 tctctctt ataattgggag cccctggg agtctacaag tggccatgga ggacagcagc
961 cgagtgtccc ccagcaagag caccagcaac atcaccaagc tgaatggcat ggtgttactg
1021 tgtaaagtgt gtggggacgt tgctcgggc ttccactacg gtgtgcacgc ctgcgagggc
15 1081 tgcaagggt tttccgtcg gagcatccag cagaacatcc agtacaaaag gtgtctgaag
1141 aatgagaatt gctccatgt ccgcatcaat cgcaaccgt gccagcaatg tgcctcaag
1201 aagtgtctct ctgtgggcat gtctcgagac gctgtgcgtt ttgggcgat ccccaaacga
1261 gagaagcagc ggatgcttc tgagtgcag agtgccatga acctggccaa caaccagtgt
1321 agcagccagt gccgctgga gacttcccc acccagcacc ccacccagg ccccatgggc
20 1381 cctcgccac cccctgtcc ggtccctca cccctggtgg gcttctcca gttccacaa
1441 cagctgacgc ctccagatc ccaagccct gagccacag tggaggatgt gatatccag
1501 gtggccggg cccatcgaga gatcttacc tacgcccag acaagctggg cagctcacct
1561 ggcaactca atgccaacca tgcatacgt agccctccag ccaccaccc acatcgctgg
1621 gaaaatcagg gctgcccacc tgccccaat gacaacaaca ccttggtgc ccagcgtcat
25 1681 aacgaggccc taaatggtct ggcagggt cctctctct acctccac ctggctctct
1741 ggccctgcac accacagctg ccaccagtc aacagcaacg ggcaccgtct atgccccacc
1801 caggtgatg cagccccaga aggcaaggca cctgccaaca gtcccggca gggcaactca
1861 aagaatgttc tgctggcatg tctatgaac atgtaccgc atggacgcag tggcgaacg
1921 gtgcaggaga tctgggagga ttctccatg agcttcacgc ccgctgtgc ggagggtgta
30 1981 gagtttgcca aacacatccc gggctccgt gaccttctc agcatgacca agtcaccctg
2041 ctaaggctg gcaccttga ggtgctgatg gtgcgcttg ctctgtgt caacgtgaag
2101 gaccagacag tgatgttct aagccgcacc acctacagcc tgcaggagct tgggtccatg
2161 ggcatgggag acctgctcag tgccatgttc gacttcagc agaagctcaa ctccctggcg
2221 ctaccaggagg aggagctggg cctcttacc gcggtggtgc ttgtctgc agaccgctcg
35 2281 ggcatggaga attccgttc ggtggagcag ctccaggaga cgctgtgc ggctcttcg
2341 gctctggtgc tgaagaaccg gccctggag acttccgct tcaccaagct gctgctcaag

```

2401 ctgccggacc tgcggaccct gaacaacatg catccgaga agctgctgtc ctccgggtg  
2461 gacgcccagt ga (SEQ ID NO: 3)

Des conditions de stringence modérées sont décrites par exemple dans  
5 Maniatis et al.. Il s'agit, à titre d'exemple, des conditions suivantes :  
incubation à 42°C pendant 12 heures dans un milieu comprenant 50%  
formamide, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's solution, 0,1% SDS.

Typiquement, l'acide nucléique recombinant ou la construction génique  
10 comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou  
des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur  
et/ou un terminateur transcriptionnel. Ces régions régulatrices sont  
choisies en fonction de l'hôte cellulaire considéré. Préférentiellement, il  
s'agit de régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de  
15 mammifères. A titre d'exemples on peut citer des promoteurs constitutifs  
ou régulés, inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou  
faibles, comme par exemple des promoteurs d'origine virale (par  
exemple : CMV, LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires. Dans un  
mode de réalisation particulier, le promoteur est le promoteur du gène  
20 Rev-erb alpha, comprenant par exemple la séquence SEQ ID NO : 1 ou une  
région de celui-ci, par exemple un promoteur comprenant la séquence  
AAAAGTGTGTCCTGGGGCA (SEQ ID NO : 2).

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la construction  
25 génique Rev-erb alpha est un acide nucléique comprenant les séquences  
SEQ ID NO : 3 et SEQ ID NO : 2, un fragment de celles-ci ou toute  
séquence s'hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence  
modérée. Dans un mode plus spécifique, la construction génique Rev-erb  
alpha est un acide nucléique comprenant une séquence codant un

polypeptide SEQ ID NO :4 liée de manière opérationnelle à un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci, notamment un promoteur transcriptionnel comprenant la séquence SEQ ID NO : 2.

5

### Cellules génétiquement modifiées

Un objet particulier de la présente invention réside dans une population de cellules comprenant un acide nucléique recombinant codant un récepteur  
10 *REV-ERB ALPHA*.

Les cellules peuvent être toute cellule cultivable, de préférence de mammifère, par exemple humaine. Il peut s'agir de cellules primaires ou de lignées établies. De préférence, les cellules hôtes sont des cellules pré-  
15 adipocytaires. De telles cellules se définissent généralement comme des cellules de type fibroblaste, qui sont capables de se différencier en adipocytes dans des conditions de culture appropriées. Plus spécifiquement, il s'agit de cellules d'origine mésodermique, incapables de se différencier en chondroblaste, en osteoblaste ou en myoblaste et qui,  
20 dans des conditions favorables propres à la cellule en question, se différencient en adipocytes et expriment plusieurs marqueurs de différenciation caractéristiques des adipocytes. Des exemples de cellules de pré-adipocytes utilisables pour la mise en œuvre de l'invention sont notamment les lignées cellulaires 3T3-L1 (Référence ATCC : CL-173),  
25 3T3-F442A (Green H. et al., Cell 5 :19-27 (1975)), ob17 (Negrel R. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA., 75 :6054-6058 (1978)) ou ob1771 (Doglio A. et al. Biochem J., 238 :123-129 (1986)).

Un objet particulier de l' invention réside donc dans un cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu' elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

5

D' autres exemples de cellules utilisables dans le cadre de l' invention sont des cellules procaryotes, des cellules de levure ou des cellules de mammifères, notamment des cellules embryonnaires ou des cellules telles que CHO, des fibroblastes, Vero, etc.

10

L' acide nucléique recombinant présent dans les cellules permet à ces cellules d' exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, ou de sur-exprimer un tel récepteur, lorsque les cellules possèdent déjà un niveau basal d' expression. Ainsi, dans le cas de cellules pré-adipocytaires, l' acide nucléique permet généralement aux cellules de sur-exprimer un récepteur *REV-ERB ALPHA*, c' est-à-dire de produire le récepteur à un niveau supérieur à celui observé dans les mêmes cellules en l' absence de construction d' acide nucléique recombinant. Le terme sur-expression désigne généralement une expression augmentée notamment d' un facteur 2, plus généralement d' un facteur 3, idéalement d' un facteur 5 au moins. Les cellules sont préférentiellement des cellules de mammifères, en particulier des cellules humaines. Il est entendu que des cellules d' autres espèces peuvent être utilisées, comme par exemple des cellules de souris, rat, singe, hamster, etc..

25

Un objet particulier de la présente invention concerne donc une cellule, notamment pré-adipocytaire, génétiquement modifiée sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le terme génétiquement modifié indique que

la cellule (ou un ancêtre de celle-ci) a été modifiée pour contenir un acide nucléique recombinant codant ledit récepteur.

Typiquement, l' acide nucléique recombinant ou la construction génique  
5 comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, une ou  
des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur  
et/ou un terminateur transcriptionnel, tels que définis ci-avant. L' acide  
nucléique peut être présent ou incorporé dans un vecteur plasmidique,  
viral, etc.. Il peut être intégré au génome des cellules, ou rester sous  
10 forme extra-chromosomique (répliquative ou non).

L' invention a également pour objet un procédé de préparation de cellules  
recombinantes exprimant un récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de  
cellules pré-adipocytaires génétiquement modifiées sur-exprimant un  
15 récepteur *REV-ERB ALPHA* ou un acide nucléique recombinant tels que  
définis ci-dessus. Le procédé de l' invention comprend, de manière  
générale, l' introduction d' un acide nucléique recombinant tel que défini  
ci-avant codant un récepteur REV ERB ALPHA dans une cellule hôte. Les  
cellules hôtes peuvent être toute population de cellules telle que décrite  
20 ci-avant, de préférence un pré-adipocyte, notamment les lignées  
cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A, ob17 ou ob1771.

Selon un premier mode de réalisation préféré de l' invention, les cellules  
recombinantes sont obtenues par transfection de cellules hôtes au moyen  
25 d' un vecteur plasmidique comprenant une construction génique Rev-erb  
alpha. Avantagusement, la transfection est réalisée en présence d' une  
seconde construction génique codant un gène de sélection ou de  
résistance, et les cellules sont sélectionnées sur la base de l' expression



dudit gène de sélection ou de résistance ainsi que de l' acide nucléique codant REV ERB ALPHA.

Au sens de l' invention, le terme « transfection » désigne, de manière  
5 générale, toute technique permettant le transfert d' un acide nucléique  
dans une cellule. Il peut s' agir de techniques chimiques, physiques,  
biologiques, etc.. A titre d' exemple, on peut citer l' électroporation, la  
précipitation au phosphate de calcium, l' utilisation d' agents facilitant la  
transfection, comme par exemple de lipides, polymères, peptides, etc., ou  
10 encore l' emploi de techniques physiques telles que le « gene gun »,  
l' utilisation de projectile, le bombardement, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre, le procédé comprend la  
cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant ledit  
15 acide nucléique recombinant et avec un vecteur plasmidique comportant un  
gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour  
leur résistance audit antibiotique et pour leur expression dudit acide  
nucléique recombinant. Selon un mode préféré de mise en œuvre de  
l' invention, les cellules recombinantes sont obtenues par co-transfection  
20 de cellules hôtes avec une construction génique Rev-erb alpha qui permet  
la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* et avec une construction  
génique qui permet la sur-expression d' un gène de résistance à un  
antibiotique. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en  
présence de l' antibiotique et testées pour leur sur-expression du  
25 récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon un mode particulier de l' invention, l' antibiotique utilisé est choisi  
parmi les substances suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs :  
néomycine, zéocine, hygromycine, blasticidine, etc..

Dans un mode particulier de mise en œuvre du procédé, l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique, les cellules étant sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur  
5 expression de l'acide nucléique recombinant.

Selon cette variante de l'invention, la construction génique *Rev-erb alpha* qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d'un gène de résistance à un antibiotique. Les cellules recombinantes sont  
10 ensuite sélectionnées en présence de l'antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l'invention l'antibiotique utilisé est choisi parmi les substances suivantes citées à titre d'exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

15

Dans un autre mode particulier de réalisation, l'acide nucléique est introduit par transfection au moyen d'un vecteur plasmidique qui comporte en outre un gène de résistance à un antibiotique et une origine de répllication eucaryote, les cellules étant sélectionnées pour leur  
20 résistance audit antibiotique et pour leur expression de l'acide nucléique recombinant. Selon un mode plus particulier, la construction génique *Rev-erb alpha* qui permet la sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* comporte donc également une cassette fonctionnelle qui permet la sur-expression d'un gène de résistance à un antibiotique et une origine de  
25 répllication eucaryote. Les cellules recombinantes sont ensuite sélectionnées en présence de l'antibiotique et testées pour leur sur-expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*. Selon un mode particulier de l'invention, l'antibiotique utilisé est choisi parmi les substances

suivantes citées à titre d' exemple non limitatifs : neomycine, zeocine, hygromycine, blasticidine, etc..

- 5 Selon un autre mode préféré de réalisation du procédé de l' invention, l' acide nucléique est introduit dans les cellules par infection au moyen d' un vecteur viral comprenant ledit acide nucléique. Selon un mode particulièrement préféré de mise en œuvre de l' invention, l' introduction est réalisée en utilisant un virus recombinant comprenant l' acide
- 10 nucléique recombinant codant le récepteur *REV ERB ALPHA* et, le cas échéant, le gène de sélection ou de résistance (« infection »).
- Différents types de virus recombinants peuvent être employés, comme par exemple des rétrovirus, des adénovirus, des AAV (Adenovirus Associated Virus), des virus de l' herpès, des baculovirus modifiés, etc.. Les virus
- 15 recombinants préférés sont les adénovirus et les rétrovirus recombinants.

Dans un mode de réalisation préféré, les cellules recombinantes (présentant avantageusement une sur-expression de l' ARN codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA*) sont obtenues par infection des cellules

20 hôtes, notamment des pré-adipocytes, au moyen de vecteurs viraux, de préférence des adénovirus ou des rétrovirus, lesdits vecteurs contenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

A cet égard, un autre objet de l' invention réside dans un vecteur viral

25 comprenant un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Un autre objet de l' invention réside dans un virus recombinant comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Préférentiellement, le vecteur viral est un vecteur défectif pour la réplication, c' est-à-dire incapable de réplication autonome dans une

cellule. Typiquement, un vecteur viral est déficient pour un ou plusieurs gènes viraux essentiels à la réplication. Dans le cas des rétrovirus, les principaux gènes viraux sont les gènes gag, pol et env. Dans le cas des adénovirus, les principaux gènes sont contenus dans les régions E1A, E1B, E4 et E2. Dans les AAV, il s'agit des régions Rep et Cap du génome. La construction de vecteurs viraux, déficients pour l'un ou plusieurs (ou l'ensemble) des gènes viraux et comprenant un acide nucléique d'intérêt est connue de l'homme de l'art. Ces techniques utilisent par exemple des lignées d'encapsidation et/ou de vecteurs ou virus helper, comme illustré dans les exemples.

Un objet particulier de l'invention concerne :

- un adénovirus recombinant déficient comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. L'adénovirus est préférentiellement un adénovirus du groupe C, notamment Ad5, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région E1A et/ou E1B et/ou E4 ;
- un rétrovirus recombinant déficient comprenant, dans son génome, un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*. Le rétrovirus est préférentiellement un rétrovirus dérivé de MLV (Mouse Leukemia Virus) ou un lentivirus, et/ou comporte avantageusement une délétion de tout ou partie de la région gag et/ou pol et/ou env.

25

Selon un mode particulier de mise en œuvre de l'invention, la préparation (e.g., transfection, infection) des cellules, notamment des pré-adipocytes est effectuée avec une construction génique *Rev-erb alpha* qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la

- SEQ ID NO : 3, une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel. Selon un mode préféré de l' invention, il s' agit de régions régulatrices fonctionnelles dans les cellules de mammifères. A titre d' exemples non
- 5 limitatifs on peut citer des promoteurs constitutifs ou régulés, inductibles ou non, sélectifs de tissus ou ubiquitaires, forts ou faibles, comme par exemple des promoteurs d' origine virale (par exemple : CMV, LTR, SV40) ou provenant de gènes cellulaires.
- 10 Selon un mode particulier de mise en œuvre de l' invention, la préparation (e.g., transfection) des cellules (e.g., pré-adipocytes) est effectuée avec une construction génique Rev-erb alpha qui comporte, outre une région codant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par exemple la SEQ ID NO : 3, le
- 15 promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple comprenant la séquence SEQ ID NO : 1, ou comprenant une région de celui-ci, par exemple de séquence SEQ ID NO : 2. Selon un autre mode particulier, la préparation est réalisée avec une séquence choisie parmi ou comprenant les séquences SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 3.
- 20 Pour la préparation des cellules recombinantes de l' invention, les cellules hôtes peuvent être mises en contact avec le gène Rev-erb alpha ou l' acide nucléique recombinant ou le vecteur ou le virus dans toute condition appropriée, puis les cellule recombinantes sont récupérées. La mise en contact peut être réalisée dans tout support adapté et dans tout
- 25 milieu de culture approprié au type cellulaire (par exemple : DMEM, RPMI, etc.).

Dans un mode de réalisation particulier, après l' infection ou la transfection, on sélectionne les lignées stables de cellules en culture. Les

cellules génétiquement modifiées préférées présentant une sur-expression du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont des lignées stables.

### Méthodes de Criblage

5

La présente invention a aussi pour objet des méthodes d'identification, de sélection, de caractérisation ou d'optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire. Ces méthodes peuvent être réalisées en tests cellulaires ou *in vitro*, par exemple par des tests de  
10 liaison. Ces méthodes utilisent essentiellement un récepteur REV ERB ALPHA (ou un acide nucléique correspondant) comme cible moléculaire.

Dans un premier mode de mise en œuvre, la présente invention a pour objet une méthode d'identification, de sélection, de caractérisation ou  
15 d'optimisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact un composé à tester avec des cellules (de préférence pré-adipocytaires) telles que définies ci-dessus, (ii) on mesure ou on détermine la différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on compare cette  
20 différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules en l'absence dudit composé à tester.

De préférence, les cellules sont des cellules pré-adipocytaires telles que décrites ci-avant, plus particulièrement des cellules pré-adipocytaires  
25 (sur-)exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*.

Selon une forme de réalisation préférée de la méthode de l'invention, on met en contact le composé à tester avec des cellules (de préférence des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB*

*ALPHA*) en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire ou d' au moins un activateur d' un gène codant un récepteur impliqué dans le programme de différenciation adipocytaire.

5

Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que, de manière surprenante, l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les cellules recombinantes de l' invention sensibilise les pré-adipocytes à l' action de facteurs de différenciation adipocytaire et favorise le  
10 programme de différenciation. Dans ces conditions, la sélection de composés modulant cette différenciation est grandement facilitée.

Dans une première variante de l' invention, on utilise au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation  
15 adipocytaire, comme par exemple et de manière non-limitative, un activateur du récepteur PPAR GAMMA. L' activateur du récepteur PPAR GAMMA est par exemple choisi dans le groupe comprenant de manière non limitative : les thiazolidinediones (rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone, KRP-297), les N-(2-  
20 benzoylphenyl)-L-tyrosines, la 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandine J2, etc..

Dans une autre variante, on utilise au moins un activateur d' un gène d' un récepteur impliqué dans le programme de différenciation  
25 adipocytaire. A titre d' exemple, non limitatif, on met en contact le composé à tester avec des cellules génétiquement modifiées sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* en présence ou en absence d' au moins un activateur du gène PPAR gamma. De préférence,

l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant :  
C/EBP beta, C/EBP delta, ADD1 (SREBP1c).

Le composé et l' activateur peuvent être mis en contact en même temps  
5 avec les cellules, ou de manière séquentielle. Typiquement, l' activateur  
est ajouté en premier, suivi du composé test.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut être réalisée par  
coloration des cellules différenciées. Le colorant est par exemple choisi  
10 dans le groupe comprenant le colorant Oil Red O, Sudan Black.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut aussi être réalisée par  
détermination du transport ou de la synthèse d' acides gras.

La mesure de la différenciation adipocytaire peut encore être réalisée par  
détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des  
15 adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi dans le  
groupe comprenant : aP2, adiposine et leptine.

La méthode de l' invention est remarquable en ce qu' elle permet :

- 20 - d' identifier des composés capables de moduler l' activité du  
récepteur *REV-ERB ALPHA*, tels que des composés capables de  
moduler l' expression du gène Rev-erb alpha ou des composés  
constituant des agonistes ou antagonistes du récepteur *REV-ERB*  
*ALPHA*. Ainsi, la méthode de l' invention permet notamment  
d' identifier des composés capables d' augmenter la  
25 différenciation adipocytaire et constituant des activateurs de  
l' expression du gène Rev-erb alpha ou des agonistes du  
récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier indirectement, en l' absence d' activateur du gène  
PPAR gamma et d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des



composés capables d' augmenter la différenciation adipocytaire qui agissent comme des agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

Selon des mises en œuvre particulières, la méthode de l' invention  
5 permet :

- d' identifier des composés capables de diminuer la différenciation adipocytaire et constituant des antagonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier des composés capables d' augmenter la  
10 différenciation adipocytaire constituant des agonistes du récepteur *REV-ERB ALPHA*.
- d' identifier, en présence d' activateur du gène PPAR gamma et/ou d' activateur du récepteur PPAR GAMMA, des composés capables de réduire la différenciation adipocytaire.
- 15 - d' identifier des composés agonistes du récepteur PPAR GAMMA.

On entend par agoniste ou antagoniste d' un récepteur un composé qui se lie audit récepteur et active ou inhibe son activité, respectivement.

20

Le composé test peut être d' origine et de nature variées. Il peut s' agir de composés isolés, d' extraits biologiques, de molécules organiques ou inorganiques, de banques de molécules (synthétiques, peptides, acides nucléiques, etc.) ou de microorganismes, etc.. Le composé test peut être  
25 mis en contact avec la construction d' acide nucléique ou les cellules sur (ou dans) tout support approprié et notamment sur une plaque, dans un tube ou une flasque, une membrane, etc.. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multipuits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on

trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus). Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites. De manière classique,  $10^3$  à  $10^6$  cellules sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière préférentielle entre  $10^4$  et  $10^5$  cellules. La quantité (ou la concentration) de composé test peut être ajustée par l'utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), le nombre de cellules, la longueur de la période d'incubation, etc.. Généralement, les cellules sont exposées à des quantités de composés test qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d'autres concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut de plus être testé en parallèle, à différentes concentrations. Par ailleurs, différents adjuvants et/ou vecteurs et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules peuvent, en outre, être utilisés si nécessaire. Le contact peut être maintenu par exemple entre quelques minutes et plusieurs heures ou jours, particulièrement entre 5 et 72 heures, généralement entre 12 et 48 heures.

Selon un autre mode de réalisation, la méthode de l'invention comprend la sélection de composés capables de moduler l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, notamment de moduler l'effet du récepteur PPAR GAMMA sur le promoteur du gène Rev-erb alpha. En effet, les inventeurs ont à présent mis en évidence que le récepteur PPAR GAMMA est responsable d'une modulation de l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA*, et que cette modulation implique une interaction entre le récepteur PPAR GAMMA et le promoteur du gène Rev-erb alpha, notamment au niveau de la région Rev-DR2 (SEQ ID NO : 2).

L' invention concerne également une méthode d' identification, de sélection, d' optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle

5 comprend (i) la mise en contact d'un composé test et d'un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en

10 l'absence de composé test, les composés test modulant la liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

La mesure de la fixation éventuelle du composé test, du récepteur PPAR

15 GAMMA ou d'un complexe formé du récepteur PPAR GAMMA et dudit composé test sur l'élément de réponse peut être effectuée par toute méthode connue de l'homme du métier par exemple en détectant un signal produit par l'élément de réponse suite à ladite fixation. Il peut s'agir de toutes méthodes directes ou indirectes, comme celles utilisant un gène

20 rapporteur, des tests de liaison, etc..

Ainsi, une méthode particulière de l'invention comprend la mise en contact d'un composé test et d'un acide nucléique comprenant la séquence Rev-DR2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence du récepteur

25 PPAR GAMMA, et la mise en évidence d'une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique. La liaison est avantageusement comparée à celle observée en l'absence de composé test. Dans un autre mode de réalisation, le composé test et le récepteur PPAR GAMMA sont mis en contact avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur

transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'activité du composé test est déterminée par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.

5

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode d'identification, de sélection, d'optimisation ou de caractérisation de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact d'un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA

15

Le gène rapporteur peut être placé sous le contrôle de tout promoteur (par exemple la SEQ ID NO : 1) dont la séquence comprend la séquence SEQ ID NO : 2 ou un variant fonctionnel de celle-ci. Cette séquence particulière peut être présente à raison d'une ou de plusieurs copies dans le promoteur (préférentiellement 1 à 10 et encore plus préférentiellement 1 à 6), en amont ou en aval ou en interne, dans la même orientation ou dans l'orientation opposée. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, le gène rapporteur est placé sous le contrôle d'un promoteur qui comprend une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2. Préférentiellement, il s'agit d'un promoteur dont le différentiel d'activité en l'absence et en présence de récepteur PPAR GAMMA ou d'un équivalent fonctionnel peut être détecté.

25

A cet égard, l'élément de réponse au récepteur PPAR GAMMA peut être associé à un promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est un promoteur transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexistante, et susceptible d'être augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (par exemple le récepteur PPAR GAMMA). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules de mammifère, c'est-à-dire produisant une expression non toxique et/ou non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par délétion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un promoteur comprenant essentiellement une boîte TATA, généralement d'une taille inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur SV40, etc..

Dans un mode de réalisation préféré, le gène rapporteur est placé sous le contrôle du promoteur du gène Rev-erb alpha, par exemple d'un promoteur comprenant la séquence non-codante de SEQ ID NO : 1.

Tout gène rapporteur peut être utilisé dans le procédé de criblage selon l'invention. Parmi ceux-ci, on peut citer par exemple le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), le gène de la luciférase de luciole (Luc) ou de Renilla (Ren), le gène de la phosphatase alcaline sécrétée (PAS) ou celui de la bêta-galactosidase ( $\beta$ -Gal). L'activité des protéines codées par ces gènes peut être facilement mesurée par des méthodes classiques et permet de connaître indirectement l'effet des

récepteurs nucléaires sur l'expression des gènes en mesurant la quantité de protéines produites et/ou leur activité enzymatique. Le système rapporteur est avantageusement introduit dans une population de cellules, qui peut être d'origine procaryote ou eucaryote.

5

Un autre objet de l' invention réside dans l' utilisation d' un composé identifié, sélectionné, caractérisé ou optimisé selon un procédé décrit ci-avant pour la préparation d' un médicament destiné à la mise en œuvre d' une méthode de traitement thérapeutique ou vaccinal du corps humain  
10 ou animal, notamment au traitement curatif ou préventif de pathologies métaboliques, en particulier du diabète, de l' obésité, de l' insulino-résistance et du syndrome X.

15

Un autre objet de l' invention réside dans un procédé de préparation d' un médicament comprenant (i) une étape de sélection d' un composé capable de moduler la différenciation adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la mise en contact d' un composé sélectionné, ou d' un analogue de celui-ci, avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

20

Un autre objet de l' invention réside dans un procédé de préparation d' un composé actif sur la différenciation adipocytaire, comprenant (i) une étape de sélection d' un composé capable de moduler la différenciation adipocytaire telle que décrite ci-avant et (ii) la synthèse d' un composé sélectionné, ou d' un analogue de celui-ci.

25

D' autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et des dessins en annexe, fournis à titre illustratif et non limitatif, dans lesquels,

- la figure 1 illustre les résultats des analyses par Northern blot des ARNm extraits de tissus adipeux de rats traités ou non à la rosiglitazone (BRL):

Des rats mâles adultes ont été traités durant 14 jours soit avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/jour) soit avec l'excipient (carboxyméthylcellulose 1%). Après sacrifice et dissection, l'ARN total a été extrait des tissus adipeux epididymal et perirénal. 10 µg d'ARNm ont été soumis à l'analyse par Northern blot en utilisant des sondes d'ADNc du récepteur *REV-ERB ALPHA* (panneau supérieur) ou de la  $\beta$ -actine (panneau inférieur).

- la figure 2 montre l'induction de l'expression de l'ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1 par la rosiglitazone (BRL).

Les pré-adipocytes 3T3-L1 se sont développés jusqu'à confluence dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal. Une fois à confluence, les cellules ont été changées dans du DMEM avec 10% sérum de veau fœtal et stimulées avec un mélange contenant de l'IBMX, de la dexaméthasone, de l'insuline, avec ou sans rosiglitazone (1µM dans de l' $H_2O$ ) durant 9 jours. L'ARN a été isolé et analysé par Northern blot.

- la figure 3 illustre l'induction de l'activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par la rosiglitazone (BRL) et le récepteur PPAR GAMMA.

Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été transfectés avec un plasmide qui comprend un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha cloné devant le gène reporteur luciférase et avec le plasmide pSG5-

PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou le vecteur vide pSG5 correspondant. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (1  $\mu$ M) et les activités luciférase ont été mesurées comme décrit précédemment.

5

- la figure 4 illustre le rôle du site Rev-DR2 dans l' induction de l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha par le récepteur PPAR GAMMA.

- 10 - la figure 4A montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur humain du gène codant le récepteur *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2.
- la figure 4B montre les effets du récepteur PPAR GAMMA sur l' activité d' une construction du promoteur du gène du récepteur humain *REV-ERB ALPHA* contenant un site sauvage ou muté Rev-DR2 cloné en deux copies
- 15 en amont du promoteur SV40.

Des cellules Cos ont été transfectées avec les constructions de reporteurs indiquées, et des plasmide pSG5-PPAR gamma ou pSG5. Les cellules ont été traitées avec de la rosiglitazone (BRL) et les activités luciférase ont

20 été mesurées.

- la figure 5 illustre des tests de mesure de la mobilité électrophorétique du récepteur PPAR GAMMA qui se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur nucléaire RXR ALPHA au site Rev-DR2 du promoteur du
- 25 gène Rev-erb alpha.

Les tests de mesure de la mobilité électrophorétique ont été effectués en utilisant les oligonucléotides indiqués, marqués en leur extrémité, en présence des récepteurs PPAR GAMMA murin, RXR ALPHA murin, REV-ERB ALPHA humain produit par lysat de réticulocytes, ou de lysats non-



programmés (lysat). Les expériences de compétition de la liaison ont été effectuées en ajoutant un excès 0, 10 ou 100 fois de l' oligonucléotide Rev-DR2 froid.

- 5 - la figure 6 montre que l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* stimule l' accumulation lipidique dans les cellules 3T3-L1.

Des cellules 3T3-L1 ont été infectées avec un rétrovirus contrôle (MFG-Neo) ou avec un rétrovirus qui permet la sur-expression du récepteur  
 10 *REV-ERB ALPHA* (MFG-Rev-erb alpha). Les cellules résultantes ont été induites pour se différencier avec ou sans rosiglitazone (BRL) à 1µM durant huit jours. Les cellules ont ensuite été fixées et colorées avec de l' Oil red O.

- la figure 6A, C et D montre des vues au microscope des cellules  
 15 colorées à l' Oil red O.

- la figure 6B montre des vues macroscopiques des plaques colorées à l' Oil red O.

- la figure 6E montre l' expression exogène ou endogène de la protéine *REV-ERB ALPHA* (Ecto-Rev ou Endo-Rev) contrôlée par Western blot.

20 Un anticorps polyclonal de lapin anti- *REV-ERB ALPHA* dirigé contre un peptide synthétique (constituée par les acides aminées 263-365 de la séquence humaine) a été utilisé pour les expériences d' immunocytochimie et de Western blotting.

25 - la figure 7 illustre l' impact de l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* sur l' expression des ARNms du récepteur PPAR GAMMA et du gène aP2 utilisé comme marqueur de la différenciation adipocytaire. Des cellules 3T3-L1 ont été infectées soit avec le rétrovirus MFG-Neo soit avec le rétrovirus MFG-Rev et traitées durant 8 jours avec

un mélange contenant de l' IBMX et de l' insuline (noté Mix), avec ou sans rosiglitazone 1  $\mu$ M. Les ARNms ont ensuite été extraits et analysés par Northern blot à l' aide des sondes indiquées.

- 5 D' autres avantages et caractéristiques de l' invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent qui reflètent les travaux mis en œuvre par les inventeurs pour aboutir à la conception et à la mise en oeuvre de la méthode de criblage.

## 10 1- MATERIELS ET METHODES

### Matériels

- La Rosiglitazone (Réf. BRL49653) est un échantillon fourni par A. Bril (SKB, Rennes, France), des cellules GP+ E86 (Columbia University, New  
15 York, U.S.A.) et le plasmide pMFG (Massachusetts Institut of Technology, Cambridge, U.S.A.).

### Animaux

- Des rats Sprague-Dawley mâles (âgés de 10 semaines) ont été traités  
20 durant 14 jours par gavage avec de la rosiglitazone (10 mg/kg/j) en suspension dans du 1% carboxyméthylcellulose. Les animaux contrôle ont reçu un volume équivalent (5 ml/kg/j) de la solution de carboxyméthylcellulose. A la fin des expériences, les animaux sont sacrifiés sous anesthésie à l' éther. Le tissu adipeux est retiré  
25 immédiatement et congelé dans de l' azote liquide.

### Analyse d' ARN.

L' extraction de l' ARN et les analyses par Northern blot ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment (Staels, B. et al. 1192,

Arterioesclerosis and Thrombosis 12(3), 286-294) en utilisant des sondes ADNc Rev-erb alpha de rat, PPAR gamma et aP2 murins, beta-actine de poulet ou 36B4 humain.

## 5 Expériences de transfection.

Les constructions qui comprennent des fragments du promoteur du gène Rev-erb alpha clonés dans le plasmide sans promoteur pGL2 ou le plasmide SV40pGL2 (Promega, Madison, WI, U.S.A.) ont été décrits précédemment (Adelmant, G. et al. 1996, Proc.natl Acad Sci.USA, 93(8), 3553-3558). Les cellules humaines d' hepatome HepG2 ont été obtenues de la Collection Européenne de culture de cellules animales (Porton Down, Salisbury, UK) et les cellules 3T3-L1 ont été obtenues de l' American Type Cell Culture (ATCC). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM, supplémenté avec 2 mM glutamine et 10% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF), dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Toutes les transfections ont été effectuées en triplica. Les activités luciférase ont été déterminées sur les extraits cellulaires totaux en utilisant un système de test de luciférase (Promega, Madison, WI, U.S.A.).

## 20 Traduction *in vitro* et EMSAs.

Les plasmides pSG5-mPPAR gamma, pSG5-mRXR alpha et pSG5-hRev-erb alpha ont été transcrits in vitro avec la polymérase T7 et traduits en utilisant le système de lysats de réticulocytes de lapin (Promega, Madison, WI, U.S.A.). Les expériences de retard sur gel avec les protéines *REV-ERB ALPHA*, PPAR GAMMA et/ou RXR ALPHA ont été effectués comme décrit préalablement (Gervois, P. et al. 1999, Molecular Endocrinology 13(3), 400-409) et Vu-Dac, N. et al. 1994, J.Biol.Chem. 269(49), 31012-31018). Pour les expériences de compétition, des quantités croissantes de la sonde froide indiquée ont été ajoutées immédiatement avant l' ajout de

l' oligonucléotide marqué. Les complexes ont été résolus dans des gels de polyacrylamide à 5%, dans un tampon 0,25 X TBE (90 mM borate, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) à température ambiante. Les gels ont été séchés et exposés pendant la nuit à - 70°C sur un film de Rayon-X (XOMAT-AR, Eastman Kodak, Rochester, NY, U.S.A.).

#### Production virale et infection.

Les cellules encapsulant le virus GP+ E86 (Markowitz, D. et al. 1988, J. Virol. 62(4), 1120-1124) sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g/l glucose) contenant 10% de sérum de veau inactivé par la chaleur (HyClone, Logan, UT, USA), 8 µg/ml de gentamicine, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO<sub>2</sub> et 95% d' air humidifié.

De manière à générer des lignées cellulaires qui de manière constitutive sur-expriment le récepteur *REV-ERB ALPHA*, la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été insérée en amont du site d' entrée du ribosome interne et du gène de résistance à la néomycine pCITE, (Novagen, Madison, WI, USA) du plasmide retroviral MFG (Dranoff, G. et al. 1993, Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 1993, 90(8), 3539-3543) en utilisant les sites NcoI-BamHI pour générer le plasmide pMFG- Rev-erb alpha.

Une construction similaire où la séquence codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* est absente est utilisé tout au long de l' étude comme contrôle (pMFG-Neo).

La construction bicistronique est conçue pour permettre l' expression simultanée du récepteur *REV-ERB ALPHA* et du produit du gène de la résistance à la néomycine des cellules infectées. Pour produire les virus recombinants, les cellules GP+ E86 (15 000/cm<sup>2</sup>) sont transfectées avec les constructions des plasmides MFG (2µg) en utilisant la lipofectamine (Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands) et en

sélectionnant les résistants en utilisant l' analogue de la généticine G418 (0,8 mg/ml, Life Technologies-Invitrogen, Groeningen, The Netherlands). Les cellules 3T3-L1 ont été infectées avec les virus MFG-Neo ou MFG-Rev-erb alpha produits par GP+ E86 comme décrit (Mattot, V. et al. 2000, Oncogene, 19(6) 762-772) et sélectionnés pour leur résistance à la généticine jusqu' à l' établissement de lignées stables (approximativement 10 jours).

#### Culture cellulaire et différenciation.

- 10 Les cellules 3T3-L1 (obtenues de l' ATCC) sont cultivées dans un milieu de culture de croissance contenant du DMEM et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont différenciées par la méthode de Bernlohr et al. (Bernlohr, D.A. et al. 1984, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81(17), 5468-5472). Des cellules post-confluentes après deux jours de culture (désigné comme
- 15 jour J0) sont transférées dans un milieu de différenciation (DMEM, 10% SVF, 1  $\mu$ m dexaméthasone, 10  $\mu$ g/ml insuline et 0,5 mM 3-méthyl-1-isobutylxanthine (IBMX)(Sigma, St Louis, MI, USA)) pendant deux jours. Ensuite les cellules ont été cultivées dans un milieu de post-différenciation (DMEM ; 10% SVF, insuline) avec ou sans rosiglitazone. Le milieu est
- 20 changé chaque jour. Des pré-adipocytes 3T3-L1 stables exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* sont cultivés dans les mêmes conditions mais différenciés sans dexaméthasone. Après le traitement, les cellules ont été fixées avec 10% formaldéhyde dans du PBS et colorés avec de l' Oil Red O (Sigma, St Louis, MI, USA). Alternativement, l' ARN total est extrait
- 25 comme décrit ci-dessus.

#### RESULTATS

L' activation du récepteur PPAR GAMMA augmente l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux du rat.

Afin de déterminer si l'activation par le récepteur PPAR GAMMA a une incidence sur l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* in vivo, des rats ont été traités avec de la rosiglitazone (notée BRL), un ligand actif et hautement spécifique du récepteur PPAR GAMMA durant 14 jours.

5 L'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* a été analysée dans les tissus adipeux épididymal et périnéal par Northern blot. Comparé avec le contrôle, le traitement avec la rosiglitazone augmente fortement les niveaux d'ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les

10 tissus adipeux étudiés (Figure 1). Les niveaux d'ARNm de la beta-actine utilisés comme contrôle ne sont pas affectés par le traitement. Ces expériences démontrent que l'activation du récepteur PPAR GAMMA par la rosiglitazone augmente l'expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans le tissu adipeux.

15 L'activation du récepteur PPAR GAMMA induit l'ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans les pré-adipocytes 3T3-L1.

Afin d'étudier le mécanisme moléculaire de cette induction, les inventeurs ont étudié la régulation de l'expression de l'ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* par la rosiglitazone dans les pré-adipocytes

20 3T3-L1 (Figure 2). Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont été cultivés jusqu'à confluence dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules confluentes ont été transférées dans un milieu contenant du sérum délipidé et les cellules ont été différenciées avec un mélange contenant de la dexaméthasone, de l'IBMX, de l'insuline, avec ou sans rosiglitazone

25 (1 µm).

Les niveaux de l'ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmentent au fur et à mesure de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Cependant, comparés avec le traitement standard de différenciation, les niveaux d'ARNm codant pour le récepteur *REV-ERB*

*ALPHA* son induits plus précocement lorsque la rosiglitazone est ajoutée. Ces niveaux étaient significativement plus élevés après 9 jours dans des adipocytes 3T3-L1 complètement différenciés.

Utilisés comme contrôle, les niveaux de l' ARNm de la beta-actine ont  
5 faiblement changé durant l' adipogenèse et ne sont pas affectés par le traitement avec la rosiglitazone.

Le récepteur PPAR GAMMA induit l' expression du récepteur *REV-ERB ALPHA* au niveau transcriptionnel.

10

Afin d' élucider si l' induction de l' ARNm du récepteur *REV-ERB ALPHA* se produit au niveau transcriptionnel, les inventeurs ont testé les effets de la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA et de la stimulation par la rosiglitazone sur l' activité transcriptionnelle d' une  
15 construction comportant un gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Des cellules 3T3-L1 ont été transfectées avec la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha en présence du vecteur  
20 d' expression pSG5-PPAR gamma qui permet l' expression du récepteur PPAR GAMMA murin ou du vecteur vide pSG5 correspondant et traitées avec de la rosiglitazone ou l' excipient.

L' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est induite par la sur-expression du récepteur PPAR GAMMA, un effet qui est par ailleurs  
25 amplifié en présence de rosiglitazone (Figure 3). Par contre, lorsque la construction comportant le gène rapporteur de luciférase sous le contrôle d' un fragment de 1,7 kb du promoteur du gène Rev-erb alpha est transfectée seule, aucun effet n' est observé. Ces données indiquent que

la transcription du gène Rev-erb alpha est induite par la rosiglitazone via l' activation du récepteur PPAR gamma.

Un élément, nommé Rev-DR2, qui présente une forte homologie, avec un élément de réponse de type « DR2 » d' un récepteur nucléaire a été  
5 identifié dans le promoteur du gène Rev-erb alpha. Il a été montré que, ledit récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie sur ce site et réprime sa propre transcription via celui-ci (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Celui-ci a par ailleurs été identifié comme étant l' élément de réponse sur lequel l' hétérodimère PPAR alpha/RXR ALPHA  
10 se fixe pour conférer une réponse aux fibrates au gène Rev-erb alpha dans le foie (Gervois et al., Mol. Endocrinol., 13, 400-409, 1999).

Pour confirmer que le site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les inventeurs ont effectué des expériences de transfections transitoires en  
15 utilisant des constructions comprenant les versions sauvages et tronquées du promoteur du gène Rev-erb alpha notées pGL2-hRev-erb $\alpha\delta$  et pGL2-hRev-erb $\alpha\Delta$  décrites précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) (Figure 4). Pour confirmer que le site Rev-DR2 peut également fonctionner comme un élément de réponse  
20 du récepteur PPAR GAMMA dans le tissu adipeux, les inventeurs ont également effectué des expériences de transfections transitoires en utilisant des constructions décrites précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558) comprenant les versions sauvages et mutées du site Rev-DR2 clonées en amont du promoteur SV40  
25 (Rev-DR2, Rev-DR2M5' et Rev-DR2M3' ) (Figure 4). La cotransfection dans les cellules HepG2 d' un vecteur d' expression du récepteur PPAR GAMMA et d' un vecteur rapporteur qui comporte deux copies du site Rev-DR2 sauvage clonées en amont du promoteur SV40 et du gène rapporteur luciférase conduit à une induction améliorée d' un facteur 2,5



de l' activité transcriptionnelle par rapport au niveau obtenu avec le vecteur d' expression pSG5 vide. Par contre, aucun effet n' est observé lorsque le vecteur rapporteur utilisé comporte deux copies du site Rev-DR2 muté soit en position 3' , soit en position 5' . L' effet de la sur-  
 5 expression du récepteur PPAR GAMMA est amplifié en présence de rosiglitazone. Ces résultats montrent clairement que l' activité du promoteur du gène Rev-erb alpha est régulée par le récepteur PPAR GAMMA et que cette induction est effectuée via le site Rev-DR2 (Figure 4).

10

Le récepteur PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec le récepteur RXR ALPHA au site Rev-DR2.

Enfin il a été recherché si le récepteur PPAR GAMMA se lie sur le site Rev-DR2. Un test de mesure de l' électromobilité (retard sur gel ou  
 15 EMSAs) a été effectué en utilisant les protéines PPAR GAMMA et RXR ALPHA synthétisées in vitro. Comme contrôle, le récepteur *REV-ERB ALPHA* produit in vitro se lie au site Rev-DR2 sauvage aussi bien comme monomère que comme homodimère (Figure 5). Par contre on n' observe pas de liaison sur l' oligonucléotide Rev-DR2 portant une mutation sur le  
 20 demi-site AGGTCA situé en 5' (M5' ) tel que décrit précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8), 3553-3558). Enfin, le récepteur *REV-ERB ALPHA* se lie en tant que monomère au site Rev-DR2 portant une mutation sur le demi-site AGGTCA situé en 3' (M3' ) tel que décrit précédemment (Adelmant, G. et al, 1996, Proc.Natl.Acad.Sci, 93(8),  
 25 3553-3558). Les récepteurs RXR ALPHA ou PPAR GAMMA seuls ne se lient à aucun des oligonucléotides indiquant que PPAR GAMMA et RXR ALPHA ne peuvent pas se lier en tant que monomères. La liaison au site Rev-DR2 a été observée lorsque le récepteur PPAR GAMMA est incubé avec le récepteur RXR ALPHA. La liaison est spécifique puisque une

compétition est établie avec un excès d' oligonucléotide non-marqué. Par contre, aucune liaison du complexe PPAR GAMMA/RXR ALPHA n' est observée sur le site Rev-DR2 muté (M5' ou M3' ). Ces expériences de liaison démontrent que PPAR GAMMA se lie en tant qu' hétérodimère avec RXR ALPHA au site Rev-DR2 intact du promoteur du gène Rev-erb alpha.

Le récepteur *REV-ERB ALPHA* augmente l' activité adipogénique du récepteur PPAR GAMMA.

10 Afin de confirmer directement la participation du récepteur *REV-ERB ALPHA* dans l' adipogenèse, la totalité du cDNA codant pour le récepteur *REV-ERB ALPHA* a été clonée dans un vecteur retroviral. Des pré-adipocytes 3T3-L1 ont ensuite été infectés avec le virus résultant. Des lignées stables établies par sélection en présence de l' antibiotique G418 (Néomycine) après infection soit avec le virus MFG-Neo (contrôle négatif), soit avec le virus MFG- Rev-erb alpha, sont mises en culture jusqu' à confluence et ultérieurement traitées avec un milieu de différenciation (noté Mix) contenant de l' IBMX, de l' insuline avec ou sans rosiglitazone notée BRL (1  $\mu$ M). L' expression endogène ou induite par infection virale de *REV-ERB ALPHA* a été vérifiée par des analyses immunocytochimiques ou par Western blot (Figure 6E). Les cellules infectées par MFG-Neo expriment des niveaux élevés de récepteur *REV-ERB ALPHA* par comparaison aux cellules contrôle infectées avec MFG-Neo.

25 En absence de rosiglitazone, l' expression exogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* induit seulement une faible différenciation morphologique des pré-adipocytes. En présence de rosiglitazone (1  $\mu$ M), on observe une augmentation de la différenciation des pré-adipocytes et de l' accumulation lipidique dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*, par rapport aux cellules contrôles. En effet, après fixation et

coloration avec du " Oil red O " , une faible accumulation de lipides est observée en absence de rosiglitazone, mais une forte accumulation lipidique est observée dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec de la rosiglitazone durant 8 jours (Figures 6A – 6D).

- 5 Pour obtenir le même résultat avec de la rosiglitazone seule sans stimulation hormonale, les cellules doivent être différenciées durant 16 jours (données non montrées).

Ces changements morphologiques se produisent en parallèle avec une variation similaire de l' ARNm des marqueurs spécifiques des adipocytes.

- 10 Les analyses par Northern blot montrent un niveau d' expression du récepteur PPAR GAMMA, et d' aP2 faible mais significatif dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* (Figure 7).

De manière surprenante, le niveau endogène du récepteur *REV-ERB ALPHA* est perturbé dans les cellules sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA*. Les niveaux d' ARNm d' aP2 et de récepteur PPAR GAMMA sont élevés dans les cellules exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* traitées avec un mélange de rosiglitazone après seulement 4 jours de différenciation (Figure 7), ou avec de la rosiglitazone seule (Figure 7). Ce phénomène n' est observé qu' après 8-12 jours dans les cellules

- 15
- 20

contrôle. Ces résultats montrent que l' expression exogène de récepteur *REV-ERB ALPHA* produit un faible effet sans la stimulation hormonale et amplifie l' induction de l' adipogenèse par l' activation par le ligand PPAR GAMMA.

- 25 C' est ainsi que l' utilisation de la lignée des cellules pré-adipocytaires de l' invention, sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* a permis l' identification du gène Rev-erb alpha comme un nouveau gène cible pour le récepteur PPAR GAMMA dans la cascade adipogénique des facteurs de transcription. Cette constatation du rôle actif du récepteur *REV-ERB*

*ALPHA* dans le processus de différenciation adipocytaire a permis aux inventeurs de mettre en oeuvre une nouvelle méthode de criblage pour identifier des composés actifs intervenant dans la modulation adipocytaire.

## REVENDICATIONS

1. Cellule pré-adipocytaire génétiquement modifiée, caractérisée en ce qu' elle comprend un acide nucléique recombinant codant un récepteur  
5 *REV-ERB ALPHA*.
2. Cellule selon la revendication 1, caractérisée en ce que le récepteur *REV-ERB ALPHA* comprend la séquence SEQ ID NO :4 ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci.
- 10 3. Cellule selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 3 ou un fragment de celle-ci.
- 15 4. Cellule selon l' une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.
- 20 5. Cellule selon l' une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé dans un vecteur plasmidique.
6. Cellule selon l' une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est incorporé dans un vecteur viral.
- 25 7. Cellule selon l' une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l' acide nucléique recombinant est intégré dans le génome de la cellule.
8. Procédé de préparation d' une cellule pré-adipocytaire selon l' une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l' on introduit dans une cellule

de pré-adipocyte un acide nucléique recombinant codant un récepteur REV  
ERB ALPHA.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les pré-  
5 adipocytes sont choisis parmi les lignées cellulaires 3T3-L1, 3T3-F442A,  
ob17 et ob1771.

10. Procédé selon l' une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que  
l' acide nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur  
10 plasmidique.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu' il comprend  
la cotransfection des cellules avec un vecteur plasmidique comprenant  
ledit acide nucléique recombinant et un vecteur plasmidique comportant un  
15 gène de résistance à un antibiotique, et en ce que les cellules sont  
sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur  
expression dudit acide nucléique recombinant.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l' acide  
20 nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur  
plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique,  
et en ce que les cellules sont sélectionnées pour leur résistance audit  
antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant.

25 13. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l' acide  
nucléique est introduit par transfection au moyen d' un vecteur  
plasmidique comportant en outre un gène de résistance à un antibiotique et  
une origine de réplication eucaryote, et en ce que les cellules sont

sélectionnées pour leur résistance audit antibiotique et pour leur expression de l' acide nucléique recombinant.

14. Procédé selon l' une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que  
5 l' acide nucléique est introduit par infection au moyen d' un vecteur viral.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l' infection est effectuée au moyen d' un adénovirus ou d' un rétrovirus recombinant.

10 16. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 15, caractérisé en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la SEQ ID No : 3 ou un fragment de celle-ci.

15 17. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 16, caractérisé en ce que l' acide nucléique recombinant comprend en outre une ou des régions de régulation de la transcription, typiquement un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel.

20 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l' acide nucléique recombinant comprend la séquence SEQ ID NO : 1 ou un fragment de celle-ci comprenant la séquence SEQ ID NO :2.

25 19. Procédé selon l' une quelconque des revendications 8 à 18, caractérisé en ce que, après l' infection ou la transfection, on sélectionne les lignées stables de pré-adipocytes en culture.

20. Méthode d' identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce que (i) on met en contact un composé à tester avec une population de cellules pré-adipocytaires

selon l' une des revendications 1 à 7, (ii) on mesure ou on détermine la différenciation adipocytaire desdites cellules et (iii), de préférence, on compare cette différenciation à la différenciation adipocytaire des mêmes dites cellules pré-adipocytaire en l' absence dudit composé à tester.

5

21. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que le composé à tester est mis en contact avec des cellules sur-exprimant le récepteur *REV-ERB ALPHA* en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.

10

22. Méthode selon la revendication 21, caractérisée en ce que l' activateur du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du récepteur PPAR GAMMA.

15

23. Méthode selon la revendication 22, caractérisée en ce que l' activateur du récepteur impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est choisi dans le groupe comprenant notamment : les thiazolidinediones, telles que rosiglitazone, troglitazone, englitazone, ciglitazone, pioglitazone, ou KRP-297, les N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosines et la 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandine J2.

20

24. Méthode selon la revendication 20, caractérisée en ce que l' on met en contact le composé à tester avec les cellules pré-adipocytaires définies dans l' une des revendications 1 à 7 en présence ou en absence d' au moins un activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire.

25



25. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce que l' activateur d' un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du gène PPAR gamma.

5 26. Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que l' activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant C/EBP beta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c).

10 27. Méthode selon l' une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce que la mesure de la différenciation adipocytaire est réalisée (i) par coloration des cellules différenciées, de préférence avec un colorant choisi parmi le colorant Oil Red O et Sudan Black, (ii) par détermination du transport ou de la synthèse d' acide gras, et/ou (iii) par détermination de l' expression d' au moins un marqueur spécifique des  
15 adipocytes différenciés, de préférence d' un marqueur choisi parmi aP2, adipsine et leptin.

20 28. Méthode d' identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend (i) la mise en contact d' un composé test et d' un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID NO : 2 ou un équivalent fonctionnel de celle-ci, en présence de récepteur PPAR GAMMA, (ii) la mise en évidence d' une liaison du récepteur PPAR GAMMA sur cet acide nucléique et, éventuellement, (iii) la comparaison de cette liaison à celle observée en  
25 l' absence de composé test, les composés test modulant la liaison du récepteur PPAR GAMMA étant des composés modulant la différenciation adipocytaire.

25. Méthode selon la revendication 24, caractérisée en ce que l'activateur d'un gène impliqué dans le processus de différenciation adipocytaire est un activateur du gène PPAR gamma.

5 26. Méthode selon la revendication 25, caractérisée en ce que l'activateur du gène PPAR gamma est choisi dans le groupe comprenant C/EBP beta, C/EBP delta et ADD1 (SREBP1c).

10 27. Méthode selon l'une quelconque des revendications 20 à 26, caractérisée en ce que la mesure de la différenciation adipocytaire est réalisée (i) par coloration des cellules différenciées, de préférence avec un colorant choisi parmi le colorant Oil Red O et Sudan Black, (ii) par détermination du transport ou de la synthèse d'acide gras, et/ou (iii) par détermination de l'expression d'au moins un marqueur spécifique des  
15 adipocytes différenciés, de préférence d'un marqueur choisi parmi aP2, adiposine et leptin.

28. Virus recombinant défectif, de préférence un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif, caractérisé en ce qu'il comprend dans son  
20 génome un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

29. Méthode d'identification de composés capables de moduler la différenciation adipocytaire, caractérisée en ce qu' elle comprend la mise en contact d' un composé test et du récepteur PPAR GAMMA avec un système rapporteur comprenant (i) un promoteur transcriptionnel  
5 comprenant une ou plusieurs copies de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant fonctionnel de celle-ci et (ii) un gène rapporteur, et l'évaluation de l'activité du composé test par mesure de son effet sur l'expression du gène rapporteur induite par le récepteur PPAR GAMMA.
- 10 30. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 20 à 29, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif d' une maladie métabolique.
- 15 31. Utilisation d' un composé identifié par une méthode selon l' une des revendications 20 à 29, ou d' un analogue de celui-ci, pour la préparation d' un médicament destiné au traitement préventif ou curatif du diabète, de l' obésité, de l' insulino-résistance et du syndrome X.
- 20 32. Virus recombinant défectif, de préférence un adénovirus ou un rétrovirus recombinant défectif, caractérisé en ce qu' il comprend dans son génome un acide nucléique codant un récepteur *REV-ERB ALPHA*.

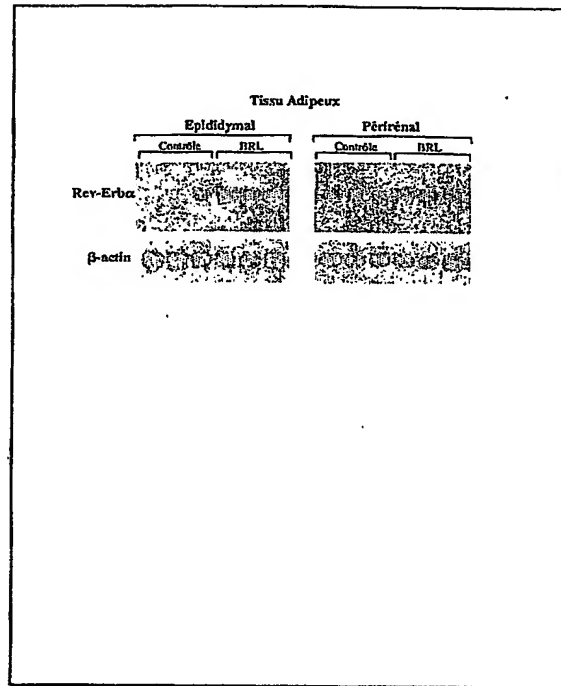


Figure 1

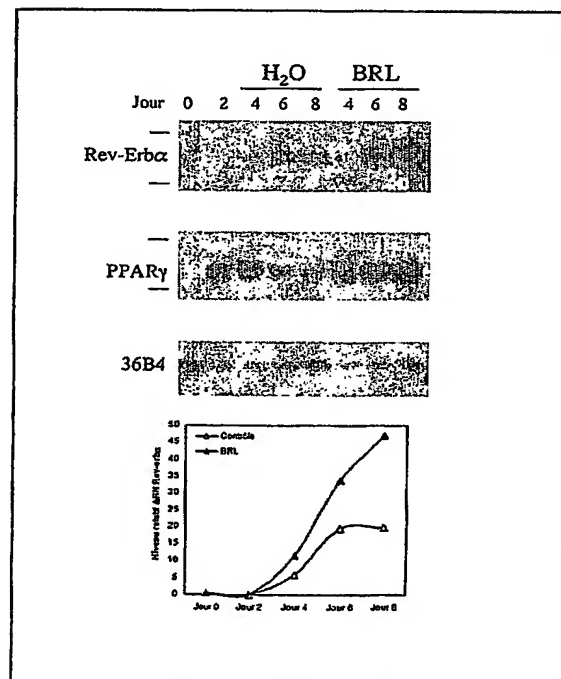


Figure 2

2/4

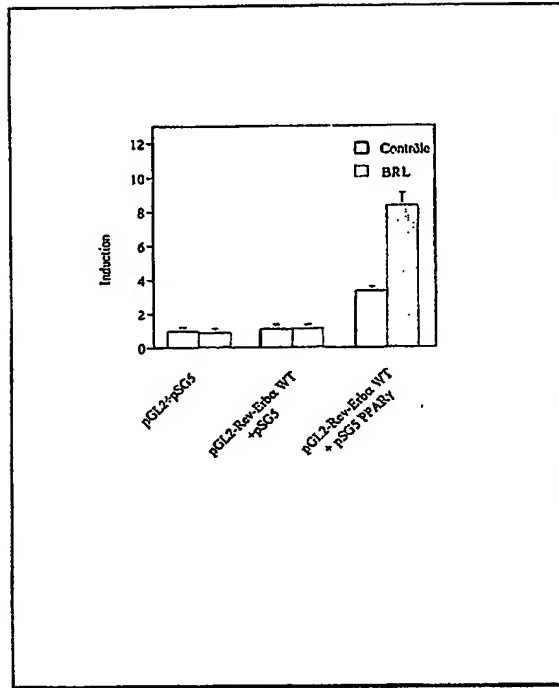


Figure 3

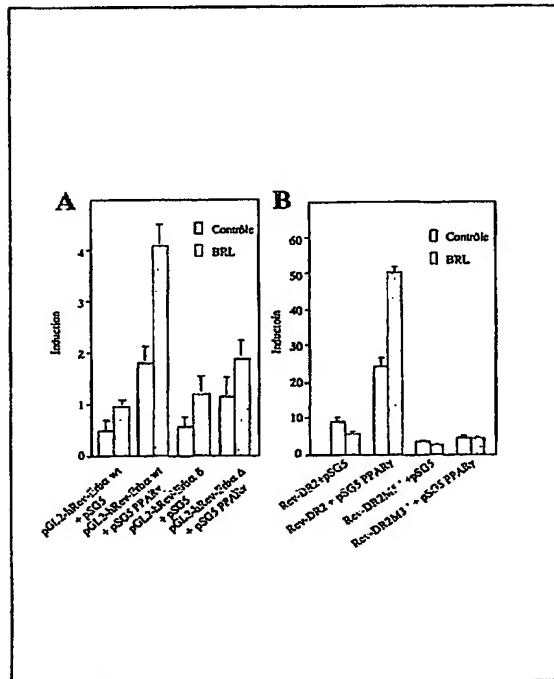
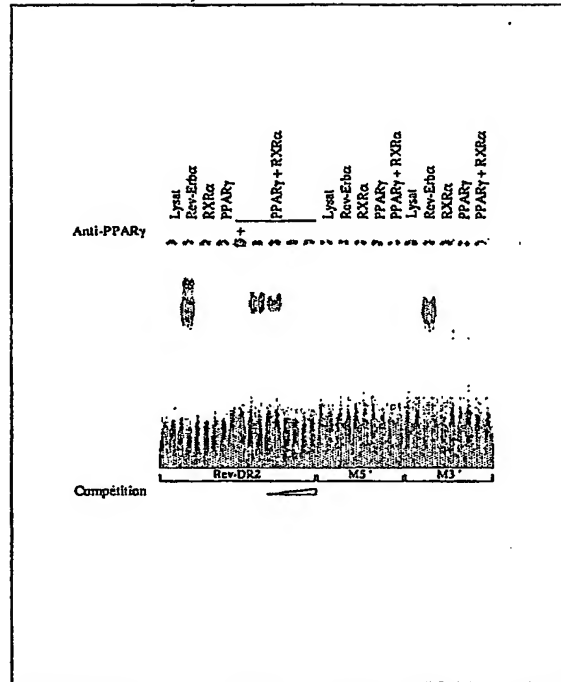


Figure 4



**Figure 5**



**Figure 6**

4/4

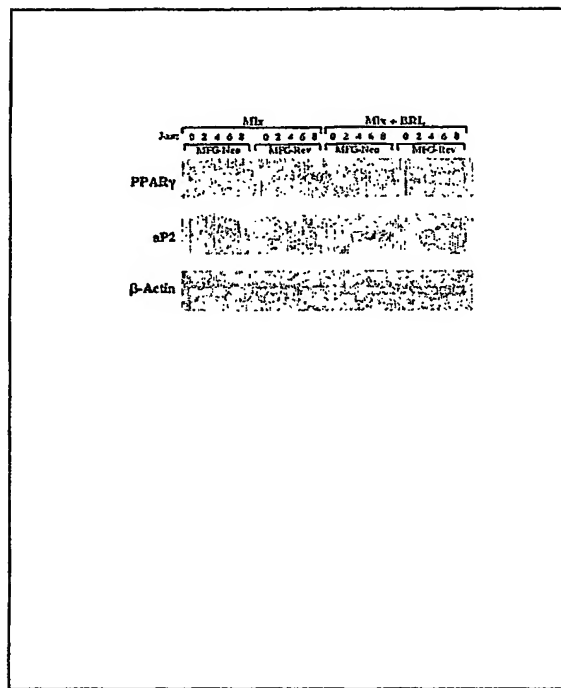


Figure 7

# LISTE DE SEQUENCES

<110> GENFIT SA

<120> Methode d'identification de substances capables de  
moduler la differentiation adipocytaire

<130> B0097FR

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1999

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaattcatgc tgcctgtgga gaagggcttc ctatgtgaag aaaaccctct ctagaagcac 60
tgggactggg gaggaattag cgggagcagc aggtggctca ggctccctct cccttcgctg 120
cctaagaagc ttccatcccc tccatgaccc aagccctcta acatgataga tctcctctac 180
ttgagatctg ttattactca tgggacagtt gctgctctga agcgaaatac tggctgtttt 240
ttgtttgttt gttttggaga cagagtctca ctctatcccc agggcggagt gcaatggcga 300
tctcggctca ctgcaacctc cacctccggg gttctagcga ttctcctgcc tcagcctcct 360
gactagctgg gattacaggc acccaccacc acatccggct aatttttgta tttttagtag 420
agacgtgggt tcaccgtggt ggtcaggctg gtctcaaact cctgacctca ggtgatcaac 480
ccacctcagc ctcaaaagt gctgggatta caggcatgag ccaaagcacc cggcaatgct 540
ggctgtttct aaccctgtt cagtatttca cttgtacatc taccacactt ccattcggg 600
gtgggcagat gaaactagca atggacgtct gaccttgggt cggtaacttc tcctaagctt 660
cctgttcccc actagtaaaa agagggaggc ttaagatgat ctacatgttc ccctctgagt 720
agtaatcttc tgtggaattc atattttatc ctccagcacc gaggggcagg ggtgtcactc 780
tgccccacc ccctgcctca cctcttcccc attactttag gacctcaaag cactttcact 840
attagttccc ctctgttgtc ctttttattt ccagacaaa gggaaatgac tcaccccaaa 900
gtcaactgga gtgggtgga tggtgtcaat acaagcaaac agggagtccc tacagacatc 960
cetacctctg tggaactcc ttccctgga ggtgttctcc ctaaggcgag tagaaggga 1020
agggggtcac atttcctttc cttctctgga ctttgccctg aagcagaggg cagcctaagc 1080
tcctgactcc agggaaatct ccctccccgg cttctctctc tcccggtcac cagtaacctc 1140
aggacgaggt cagtctgca atcacgtgaa gccctcacgt ttgcaagggt tgcagaaagg 1200
gcctcttagc tttgatctcc cagacagcaa acaagcttgc cagtccctcc ccagaaattc 1260
acatgcccct gccatacagg ctttctaaac acgccaccct gactcttcag cgcacccac 1320
cccacccac tctcagctcc tcccaggctc cggcaagcgc tttgccaggc agaaagggga 1380
aaggcacgca gtccgccac tttgtcgtg gactacaaat cccgacagtc ttgtcgttgc 1440
gcaggcgcg cagagctcaa cgtgccggct gttggaaaag tgtgtcactg gggcaccgag 1500
gcgtccctg ggatcacatg gtacctgctc cagtgccgag tgcggcccg gaaccctggg 1560

```



```

ctgctggcgc ctgcgcagag cctctgtgcc cagggaaagg ctggggcaaa aggcggctga 1620
gattggcaga gtgaaatatt actgccgagg gaacgtagca gggcacacgt ctgcctcttt 1680
tgcgactcgg tgccccgttt ctccccatca cctacttact tcctggttgc aacctctctt 1740
cctctggggac ttttgcaccg ggagctccag attcgctacc ccgcagcgct gcggagccgg 1800
caggcagagg caccgccgtac actgcagaga cccgaccctc cttgctacct tctagccaga 1860
actactgcag gctgattccc cctacacact ctctctgctc ttcccatgca aagcagaact 1920
ccgttgccctc aacgtccaac ccttctgcag ggctgcagtc cggccacccc aagaccttgc 1980
tgcagggtgc ttcggatcc                                     1999

```

<210> 2  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: Rev-DR2

<400> 2  
 aaaagtgtgt cactggggca 20

<210> 3  
 <211> 1845  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1845)  
 <223> REV ERB ALPHA

<400> 3

atg	acg	acc	ctg	gac	tcc	aac	aac	aac	aca	ggt	ggc	gtc	atc	acc	tac	48
Met	Thr	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Asn	Thr	Gly	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	
1				5					10					15		

att	ggc	tcc	agt	ggc	tcc	tcc	cca	agc	cgc	acc	agc	cct	gaa	tcc	ctc	96
Ile	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Thr	Ser	Pro	Glu	Ser	Leu	
			20					25					30			

tat	agt	gac	aac	tcc	aat	ggc	agc	ttc	cag	tcc	ctg	acc	caa	ggc	tgt	144
Tyr	Ser	Asp	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Gly	Cys	
			35				40					45				

ccc	acc	tac	ttc	cca	cca	tcc	ccc	act	ggc	tcc	ctc	acc	caa	gac	ccg	192
Pro	Thr	Tyr	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	
			50				55				60					

gct cgc tcc ttt ggg agc att cca ccc agc ctg agt gat gac ggc tcc	240
Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser	
65 70 75 80	
cct tct tcc tca tct tcc tcg tcg tca tcc tcc tcc tcc ttc tat aat	288
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr Asn	
85 90 95	
ggg agc ccc cct ggg agt cta caa gtg gcc atg gag gac agc agc cga	336
Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg	
100 105 110	
gtg tcc ccc agc aag agc acc agc aac atc acc aag ctg aat ggc atg	384
Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met	
115 120 125	
gtg tta ctg tgt aaa gtg tgt ggg gac gtt gcc tcg ggc ttc cac tac	432
Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr	
130 135 140	
ggt gtg cac gcc tgc gag ggc tgc aag ggc ttt ttc cgt cgg agc atc	480
Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile	
145 150 155 160	
cag cag aac atc cag tac aaa agg tgt ctg aag aat gag aat tgc tcc	528
Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser	
165 170 175	
atc gtc cgc atc aat cgc aac cgc tgc cag caa tgt cgc ttc aag aag	576
Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys	
180 185 190	
tgt ctc tct gtg ggc atg tct cga gac gct gtg cgt ttt ggg cgc atc	624
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile	
195 200 205	
ccc aaa cga gag aag cag cgg atg ctt gct gag atg cag agt gcc atg	672
Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met	
210 215 220	
aac ctg gcc aac aac cag ttg agc agc cag tgc ccg ctg gag act tca	720
Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser	
225 230 235 240	
ccc acc cag cac ccc acc cca ggc ccc atg ggc ccc tcg cca ccc cct	768
Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro	
245 250 255	

gct ccg gtc ccc tca ccc ctg gtg ggc ttc tcc cag ttt cca caa cag	816
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln	
260 265 270	
ctg acg cct ccc aga tcc cca agc cct gag ccc aca gtg gag gat gtg	864
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val	
275 280 285	
ata tcc cag gtg gcc cgg gcc cat cga gag atc ttc acc tac gcc cat	912
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His	
290 295 300	
gac aag ctg ggc agc tca cct ggc aac ttc aat gcc aac cat gca tca	960
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser	
305 310 315 320	
ggg agc cct cca gcc acc acc cca cat cgc tgg gaa aat cag ggc tgc	1008
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys	
325 330 335	
cca cct gcc ccc aat gac aac aac acc ttg gct gcc cag cgt cat aac	1056
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn	
340 345 350	
gag gcc cta aat ggt ctg cgc cag gct ccc tcc tcc tac cct ccc acc	1104
Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr	
355 360 365	
tgg cct cct ggc cct gca cac cac agc tgc cac cag tcc aac agc aac	1152
Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn	
370 375 380	
ggg cac cgt cta tgc ccc acc cac gtg tat gca gcc cca gaa ggc aag	1200
Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys	
385 390 395 400	
gca cct gcc aac agt ccc cgg cag ggc aac tca aag aat gtt ctg ctg	1248
Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu	
405 410 415	
gca tgt cct atg aac atg tac ccg cat gga cgc agt ggg cga acg gtg	1296
Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val	
420 425 430	
cag gag atc tgg gag gat ttc tcc atg agc ttc acg ccc gct gtg cgg	1344
Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg	
435 440 445	

gag gtg gta gag ttt gcc aaa cac atc ccg ggc ttc cgt gac ctt tct 1392  
 Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser  
 450 455 460

cag cat gac caa gtc acc ctg ctt aag gct ggc acc ttt gag gtg ctg 1440  
 Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu  
 465 470 475 480

atg gtg cgc ttt gct tcg ttg ttc aac gtg aag gac cag aca gtg atg 1488  
 Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met  
 485 490 495

ttc cta agc cgc acc acc tac agc ctg cag gag ctt ggt gcc atg ggc 1536  
 Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly  
 500 505 510

atg gga gac ctg ctc agt gcc atg ttc gac ttc agc gag aag ctc aac 1584  
 Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn  
 515 520 525

tcc ctg gcg ctt acc gag gag gag ctg ggc ctc ttc acc gcg gtg gtg 1632  
 Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val  
 530 535 540

ctt gtc tct gca gac cgc tcg ggc atg gag aat tcc gct tcg gtg gag 1680  
 Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu  
 545 550 555 560

cag ctc cag gag acg ctg ctg cgg gct ctt cgg gct ctg gtg ctg aag 1728  
 Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys  
 565 570 575

aac cgg ccc ttg gag act tcc cgc ttc acc aag ctg ctg ctc aag ctg 1776  
 Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu  
 580 585 590

ccg gac ctg cgg acc ctg aac aac atg cat tcc gag aag ctg ctg tcc 1824  
 Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser  
 595 600 605

ttc cgg gtg gac gcc cag tga 1845  
 Phe Arg Val Asp Ala Gln  
 610 615

<210> 4  
 <211> 614

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr
 1          5          10          15
Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu
 20          25          30
Tyr Ser Asp Asn Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys
 35          40          45
Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro
 50          55          60
Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser
 65          70          75          80
Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr Asn
 85          90          95
Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg
 100          105          110
Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met
 115          120          125
Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr
 130          135          140
Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile
 145          150          155          160
Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser
 165          170          175
Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys
 180          185          190
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile
 195          200          205
Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met
 210          215          220
Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser
 225          230          235          240
Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro
 245          250          255
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln
 260          265          270
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val
 275          280          285
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His
 290          295          300
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser
 305          310          315          320
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys
 325          330          335
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn
 340          345          350

```

Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
 355 360 365  
 Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys  
 385 390 395 400  
 Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu  
 405 410 415  
 Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val  
 420 425 430  
 Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg  
 435 440 445  
 Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser  
 450 455 460  
 Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu  
 465 470 475 480  
 Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met  
 485 490 495  
 Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly  
 500 505 510  
 Met Gly Asp Leu Leu Ser Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu Asn  
 515 520 525  
 Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val  
 530 535 540  
 Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu  
 545 550 555 560  
 Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys  
 565 570 575  
 Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu  
 580 585 590  
 Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser  
 595 600 605  
 Phe Arg Val Asp Ala Gln  
 610



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11 235 02

### DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260399

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0097FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0200582	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) METHODE D'IDENTIFICATION DE SUBSTANCES CAPABLES DE MODULER LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE			
LE(S) DEMANDEUR(S) : GENFIT			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		STAELS	
Prénoms		Bart	
Adresse	Rue	22, rue de la Houille	
	Code postal et ville	7850	PETIT ENGHIEU (Belgique)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 18 janvier 2002			
BECKER Philippe n° 97-0080			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**